

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CAMPUS PATOS DE MINAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCISCO MANOEL FERREIRA PAULA

PRODUÇÃO DE HOLOCELULASES POR ISOLADO FÚNGICO CULTIVADO EM
BIOMASSA RESIDUAL DE SAFRAS AGRÍCOLAS

PATOS DE MINAS - MG
JULHO DE 2019

FRANCISCO MANOEL FERREIRA PAULA

**PRODUÇÃO DE HOLOCELULASES POR ISOLADO FÚNGICO CULTIVADO EM
BIOMASSA RESIDUAL DE SAFRAS AGRÍCOLAS**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte

PATOS DE MINAS - MG

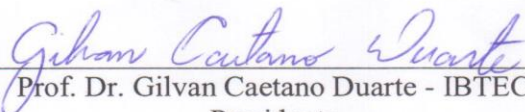
JULHO DE 2019

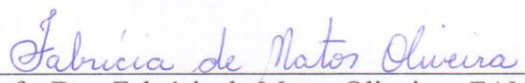
FRANCISCO MANOEL FERREIRA PAULA

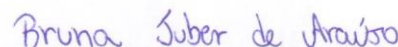
Produção de holocelulases por isolado fúngico cultivado em biomassa residual de safras agrícolas

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:


Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte - IBTEC
Presidente


Profa. Dra. Fabícia de Matos Oliveira - FAMAT
Membro


Ms. Bruna Juber de Araújo - PPGBIOTEC
Membro

Patos de Minas/MG, 08 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus, por me permitir iniciar e agora finalizar esse ciclo em minha vida, ultrapassando qualquer barreira e superando todas as dificuldades do início até aqui.

Agradecer também as pessoas mais especiais da minha vida, minha mãe Lúcia Souto a qual trabalhou e abdicou de “viver” sua vida, para satisfazer minhas vontades, e nunca me deixar passar vontade de nada, não me deixou desistir, que sempre me amparou nos momentos frágeis e difíceis dessa caminhada. Não mais tão importante a minha avó Célia, que sempre foi a responsável por mimar, por fazer os meus gostos e vontades, minha mamãe mais velha. O papel de pai, que sempre foi feito por duas pessoas que não teriam obrigação nenhuma, porém feito pelo meu avô Manoel e, meu tio Israel, responsável por vários puxões de orelha e sempre querer meu bem, por desempenhar o real papel de pai mesmo, estar presente nos bons momentos e nos ruins também, sou grato por sempre me amparar. Aos demais familiares (irmão, tios, tias) meu muito obrigado.

Ao meu orientador só tenho que agradecer por tudo, por ser essa pessoa compreensível, calma, que me disse palavras de conforto quando pensei em desistir, pelo excelente profissional e pela incrível pessoa que é. Agradeço imensamente aos participantes de minha banca Profa. Dra. Fabrícia Matos, que além de ser uma pessoa inenarrável, uma profissional de excelência, minha amiga, minha mãe de consideração, a outra participante Ms. Bruna Juber, pessoa incrível a qual tive oportunidade de conhecer durante a graduação, colega de profissão, amiga, obrigado a vocês por terem aceitado o convite de participação.

Conheci pessoas incríveis que ao longo da trajetória foram se tornando minha família, por estarem sempre presentes, por fazerem parte da minha vivência diária, nos meus momentos de alegria e de tristeza também. Outras só passaram e se distanciaram com o passar do tempo. Em agradecimento especial ao Bruno Ramos e Bruno Henrique, os quais sempre estiveram presentes nas minhas angústias, nos meus perrengues assim como estiveram na grande maioria dos momentos, que foram momentos de alegria, de partilhar lembranças que já mais serão esquecidas. Aos meus amigos conterrâneos que mesmo com a distância sempre quiseram meu sucesso, minha felicidade. Ao B.M, turma de amigos de Campina Verde-MG, nem sei o que dizer!! A minha turma de amigos também, formada em Patos de Minas por Raíssa, Rafael, Juber, Migs, Gabi, que apesar de trilharem caminhos diferentes e permanecermos distantes, ao mesmo tempo estamos sempre conectados, é impossível contar as inúmeras passagens que digo: Por que e como fizemos isso? A turma do vôlei, da Atlético que foi um sonho nosso e

realizamos, aos amigos do Studio Wagner Fagundes, a minha turma não de pessoas mais velhas e sim experientes. Quero também agradecer as minhas 2 mães adotivas em Patos de Minas (Fabrícia Matos e Célia Ramos), minha gratidão a vocês.

Por fim venho agradecer a todo corpo docente e técnicos da UFU por terem me transmitido o conhecimento que vocês têm, de me proporcionar experiências e desafios que são inexplicáveis, por fazerem parte do meu amadurecimento e me fazer chegar onde cheguei. Aqui me despeço da UFU Campus Patos de Minas, e só tenho imensamente a agradecer por tudo que vivi durante minha graduação.

RESUMO

O Brasil como um grande produtor de safras agrícolas, não possui na maioria das vezes um fim determinado aos resíduos agrícolas gerados, descartando-os de forma incorreta, prejudicando o meio ambiente. Para resolução do tal problema, estudos são feitos para a utilização desses resíduos por microrganismos no processo de degradação da parede lignocelulósica. Os fungos filamentosos são capazes de produzirem, em condições favoráveis, enzimas que conseguem catalisar a produção de açúcar mais simples, a partir de carboidratos mais complexos. Pensando nisto, o trabalho teve como principal objetivo a utilização de um fungo anemofílico isolado na área central de Patos de Minas em frente aos laboratórios da UFU, para produção de xilanase, pectinase e CM-celulase. O fungo denominado MFM, apresentou características morfológicas do gênero *Aspergillus*. As atividades enzimáticas quantificadas mostraram que a MFM produziu as três enzimas nas diferentes biomassas residuais, ofertadas como fontes de carbono, tendo destaque na produção de enzimas o resíduo do completo da soja (RS) com os valores em UI.mL⁻¹ de, 1,095; 1,237; e 0,262 para xilanase, pectinase e CM-celulase respectivamente. Ensaio de caracterização enzimática parcial, revelaram as melhores condições de atividade em pH 4 e temperatura de 50°C, para as enzimas produzidas em RS. Segundo às melhores condições de atuação das enzimas, ensaios de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar lavado, revelaram que, após 48 horas de incubação, a 50°C, a liberação de açúcar redutor total alcançada foi de 7,49%.

Palavras-chave: Prospecção de fungos. Resíduos agrícolas. Enzimas. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

As a top agricultural producing country, Brazil does not have a properly destination for agricultural waste, putting it away incorrectly and damaging the environment. In order to solve this issue, studies have been made to use these agricultural leavings by microorganisms in the process of degradation of the lignocellulosic wall. Filamentous fungi are able to produce, at friendly conditions, enzymes that can catalyze the production of simpler sugar from complex carbohydrates. From that, this study aimed the application of an air fungus isolated in the central area of Patos de Minas, in front of UFU's laboratories, for the production of xylanase, pectinase and CM-cellulase. The isolated, called MFM, revealed morphological features of the genus *Aspergillus*. The enzymatic activities assays showed that MFM produced the three enzymes in the different residual biomasses used as carbon sources. Complete soybean residue (RS) highlighted in the production of enzymes with values in U_l.mL⁻¹ from 1,095; 1,237; and 0,262 for xylanase, pectinase and CM-cellulase, respectively. Partial enzymatic characterization tests revealed the best activities conditions for pH 4 and temperature at 50°C, for enzymes produced in RS. According to the best performance conditions of enzymes, hydrolysis tests of washed sugarcane bagasse hydrolysis showed that, after 48 hours of incubation at 50°C, the liberation of total reductive sugar reached was 7.49%.

Keywords: Fungi prospection. Agricultural residues. Enzymes. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR – Açúcar Redutor
CA – Casca de arroz
BDA – Batata dextrose ágar
EB-RS – Extrato bruto de MFM cultivado em RS
Ex – Extrato bruto
RC – Resíduo do beneficiamento do café
RCL – Resíduo do beneficiamento do café lavado
CM – carboximetil
CMC – carboximeltil celulase
DNS – Ácido 3,5-dinitro-salicílico
EB – Engaço de bananeira
EBL – Engaço de bananeira lavado
MFM – Morfoespécie Fungo Marrom
rpm – Rotação por minuto
RS – Resíduo completo da soja
UV – ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hidrólise do polímero celulose a glicose por meio da ação de enzimas. Em vermelho: estrutura cristalina. Em preto estrutura amorfa.	17
Figura 2 - Placa de Petri contendo meio BDA, que foi exposta ao ambiente externo do Prédio dos laboratórios, colonizada pelos fungos anemófilos após o período de 7 dias de incubação.	19
Figura 3 - Extratos brutos enzimáticos produzidos a partir do cultivo de fungo isolado em resíduos agrícolas.....	21
Figura 4- Tubos contendo os ensaios enzimáticos para: 3A- xilanase, 3B- pectinase e 3C- CM-celulase.....	22
Figura 5 - Anverso da placa de Petri contendo meio BDA, onde foram visualizadas diversas morfoespécies (fungos e bactérias), após incubação a temperatura ambiente (~25°C) por 7 dias. MFM foi marcado por um quadrado azul.	25
Figura 6– Placa de Petri colonizada com a MFM a partir do fungo selecionado na placa inicial.	26
Figura 7– Imagens microscópicas da amostra da MFM corada com: a) KOH 20% e b) Azul de Metileno. Imagens obtidas em microscópio Leica ICC50 HD e software LEICA Application Suite (LAS) EZ Version 3.3.	26
Figura 8- Amostra de cultivo do fungo <i>A. oryzae</i> em meio sólido (A); estruturas como esporos e conídios observadas em lâmina microscópica (B), visualizada em microscópio de luz.	27
Figura 9– Imagens de grandes colônias de fungos e de suas respectivas microscopias de luz e eletrônicas de varredura de: <i>Aspergillus nidulans</i> (A e B); <i>Aspergillus oryzae</i> (C e D).	27
Figura 10 - Atividades enzimáticas (xilanase, pectinase e CM-celulase) dos extratos brutos obtidos após cultivo do isolado MFM em resíduos agrícolas (CA - casca de arroz; RC - resíduo do beneficiamento do café; EB - engaço de bananeira; RS - resíduo completo da soja; RCL – resíduo do beneficiamento do café lavado e EBL – engaço de bananeira lavado), após incubação por 5 dias à temperatura ambiente (~25°C.).	28
Figura 11– Dosagem de proteína total (método de Bradford) e açúcar redutor total (AR-total) dos extratos brutos enzimáticos, produzido pelo isolado MFM durante o cultivo nos resíduos agrícolas (casca de arroz, resíduo completo da soja e resíduo do beneficiamento do café). As quantificações foram expressas em mg.mL ⁻¹	31
Figura 12 – Influência da temperatura nas atividades enzimáticas (xilanase, pectinase e CM-celulase) presentes no extrato bruto enzimático produzido por MFM após cultivo no resíduo completo da soja (RS). Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descrito.	32
Figura 13- Influência do pH na atividade das enzimas presentes no EB enzimático produzido por MEB após cultivo no resíduo casca de arroz. Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme item 3.5, ajustando dentro do volume final de reação (75 µL), a inclusão do volumen de 37,5 µL de cada tampão testado: acetato de sódio (4,5), fosfato de sódio (6,5) e Tri-HCl (8,0), todos a 0,1 mol.L ⁻¹ . As demais etapas seguiram conforme descrito.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos extratos brutos enzimáticos produzidos pelo isolado fúngico, cultivados em resíduos agrícolas.	21
Tabela 2 - Estatística aplicada às médias aritméticas das atividades enzimáticas produzidas por MFM quando cultivado em diferentes resíduos agrícolas.	29
Tabela 3 - Representação dos valores de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar “lavado” e “explodido a vapor”, representados pela dosagem de açúcar redutor total (AR-total), nos tempos de 0, 12, 24, 38 e 48 horas.....	34

SUMÁRIO

1 INTODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Brasil como produtor de safras e resíduos agrícolas.....	12
2.2 Parede celular vegetal	14
2.3 Atividades das enzimas fúngicas	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Coleta, isolamento, manutenção e identificação das amostras fúngicas.....	18
4.2 Resíduos Agrícolas.....	19
4.3 Cultivo do isolado fúngico	20
4.4 Produção dos extratos brutos enzimáticos	20
4.5 Atividades enzimáticas: xilanase, pectinase, endogluconase (CM-celulase).....	22
4.6 Dosagem do açúcar redutor total liberado	23
4.7 Dosagem de proteínas totais.....	23
4.8 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática dos filtrados.....	23
4.9 Efeito do pH sobre a atividade enzimática dos filtrados.....	23
4.10 Atividade de hidrólise com bagaço de cana-de-açúcar	24
4.11 Análises estatísticas.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Coleta, isolamento, manutenção e análise morfológica das amostras fúngicas	25
5.2 Caracterização dos extratos brutos enzimáticos.....	28
5.3 Açúcar redutor total e proteína total.....	30
5.4 Efeito da temperatura e do pH sobre as atividades enzimáticas	31
5.5 Hidrólise Enzimática.....	33
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
APÊNDICES	40

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor na área da agricultura, tendo assim a produção de uma gama de resíduos agrícolas, que na grande maioria são eliminados de forma incorreta, gerando prejuízos à natureza. Com a Biotecnologia, formas de reaproveitamento são sugeridas para o uso desses resíduos para que os mesmos sejam aproveitados, gerando produtos e diminuindo cada vez mais os efeitos ambientais.

A utilização de enzimas degradadoras da biomassa lignocelulósica tem despertado nas indústrias um grande interesse, podendo substituir os catalisadores químicos, com maior eficiência nos resultados e diminuindo o impacto ambiental gerado. A aplicação dessas enzimas se dá em diferentes áreas tais como indústria têxtil, alimentícia, em biorrefinarias, nutrição animal, etc.

Esse trabalho tem como principal foco a utilização de fungo anemofílico na degradação da biomassa lignocelulósica vegetal que é produzida em grande escala, visando um produto final, diferentes enzimas, de forma ambientalmente correta, com custos mais baixos.

Para isso, foi utilizado um dos fungos isolados do ar atmosférico, em frente aos laboratórios da UFU na região central de Patos de Minas, sendo caracterizado macro e microscopicamente, realizadas atividades, as quais dariam condições mais favoráveis de atuação das enzimas, para posteriormente fazer uma aplicação na área biotecnológica.

A enzima selecionada por meio de ensaios laboratoriais, tiveram suas condições de pH, temperatura ajustados para uma melhor eficácia de hidrólise, nos forneceram dados os quais foram aplicados na hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar, de grande interesse em indústrias canavieiras e em biorrefinarias. Com isso a biotecnologia torna-se uma ferramenta que agrega valor à insumos, os quais, até o presente momento são subutilizados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Brasil como produtor de safras e resíduos agrícolas

O Brasil se encontra atualmente em lugar de destaque no cenário mundial. Além de estar entre as maiores economias do mundo, possui mais de 208 milhões de habitantes e a quinta maior área em território. O país possui uma grande atividade agrícola, o que faz com que seja o Brasil um dos países com maior produção de resíduos agroindustriais (IBGE, 2018). O setor

agrícola é o grande responsável por esses índices, que vem se desenvolvendo e crescendo suas áreas de produção nas últimas décadas. A diversificação do clima do país se torna benéfico a pluralidade na agricultura, uma vez que são inúmeras cultivares produzidas em toda área brasileira (Indicadores de Desenvolvimento Mundial - IDM, 2014).

A nona posição mundial é ocupada pelo Brasil em termos de produção de arroz, tendo a produção na safra de 2017 de aproximadamente 11,3 milhões de toneladas dos grãos em casca (FAO STAT, 2017). O subproduto mais significativo gerado do beneficiamento é a casca do arroz, representando cerca de 20% da massa do arroz em casca (PANDEY et al., 2010).

A cada ano que se passa a produção dos resíduos gerados pelas safras agrícolas tem sido aumentada, necessitando de alguma forma, fazer a utilização dessa biomassa lignocelulósica, evitando que a mesma seja descartada de forma indevida no meio ambiente (BOMTEMPO et al., 2017). A casca do arroz é um resíduo que possui uma capa lenhosa rígida composta por celulose, lignina e materiais inorgânicos além de disponibilizar matéria de baixo custo, de difícil utilização, com baixas propriedades nutritivas (KIELING, 2009).

O Brasil também se destaca pela safra de café, a qual teve produção de aproximadamente 44,77 milhões de sacas em 2017 (EMBRAPA, 2017). O café tem sido a segunda maior *commodity* na bolsa de valores só perdendo para o petróleo, e a elevada demanda por seu uso gera uma grande quantidade de resíduos (GIROTTO et al., 2017). Os grãos de café são beneficiados por um processo de torra que é responsável pelas suas características organolépticas, nomeadamente o sabor, o aroma e a cor, dependendo do tempo e temperatura de torra aplicado (MUSSATTO et al, 2011). O processo de torra faz com que existam alterações químicas e físicas nos grãos fazendo com que os teores de cafeína, ácidos clorogênicos, proteínas, aminoácidos e hidratos de carbono sejam diminuídos (MUSSATTO et al, 2011b).

Outra produção agrícola que o Brasil se destaca é na safra de soja. No atual cenário mundial, o país é o segundo maior produtor e exportador de soja, ficando atrás apenas do Estados Unidos, produzindo uma safra superior a 116 milhões de toneladas em 2017, onde nesse mesmo ano teve uma ocupação de 35,100 milhões de hectares em território brasileiro. A produção de grandes quantidades de soja, mundialmente, faz com que os resíduos dessa cultura sejam os mais expressivos em volume, contendo grande potencial como substrato para o crescimento de microrganismos lignocelulolíticos e indução da secreção de suas enzimas, assim como para a bioconversão em produtos de alto valor agregado (SCIUTO, 2015).

Destaca-se também a produção de banana no Brasil ocupa o segundo lugar em volume de frutas produzidas e a terceira posição em área colhida. Está entre as frutas mais consumidas nas principais regiões do país. Constitui base alimentar nas mais diferentes classes da

população, tendo um consumo *per capita* de mais ou menos 25 kg ano (GASPARATORO, 2010). Após sua colheita é gerado grandes quantidades de resíduos, considerado os mais importantes em termos de maiores volumes e potencial fibroso o pseudocaule, a folha e o engaço. As folhas e os pseudoscaules são utilizados em coberturas mortas no solo, com finalidade de evitar processos erosivos, controlar plantas daninhas e retornar nutrientes a planta; já o engaço não se tem uma utilização, sendo o mesmo descartado depois de ser separados das pencas, sendo descartados no lixo doméstico ou sobre o solo, causando problemas ambientais, além de implicar no custo de transporte para o descarte (SOFNNER, 2001).

O resíduo da palha da cana-de-açúcar se destaca devido sua capacidade de reaproveitamento. Ele tem capacidade tanto para geração e produção de calor, eletricidade e para gera o etanol celulósico (SANTOS et. al., 2012). Contudo, mesmo com esse potencial de produção, a degradação destes polímeros, não é tão facilitada devido à forte interação intermolecular entre estes e a total ausência de água em sua estrutura. Além dessa difícil degradação, a macromolécula lignina envolve a celulose e a hemicelulose, fazendo-a uma estrutura muito recalcitrante, ou seja, as características morfológicas e química estrutural da parede vegetal, constituem uma dificuldade para as tentativas de degradação (FENGEL, 1985).

A produção em agrícola massa desencadeia uma enorme geração de resíduos agroindustriais, com isso faz-se necessário que sejam tomadas medidas racionais de utilização, tratamento e descarte para que esses resíduos não venham causar prejuízos ao meio ambiente. Contudo uma das propostas racionais que condizem com os anseios sócio econômico-ambientais, tratam com importância esses resíduos como fonte alternativa para crescimento de microrganismos e para produção de enzimas (BISWAS et al., 2014)

2.2 Parede celular vegetal

A parede celular vegetal possui em sua composição uma mistura de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. Os polissacarídeos representam cerca de 90% do peso seco da parede e consistem em celulose, que compõe de 20 a 40% da parede celular, hemiceluloses (15-25%) e pectinas (~30%). Essa matriz é altamente organizada e dinâmica podendo tornar-se mais rígida ou mais frouxa conforme as necessidades da planta (EMBRAPA, 2011), que tem como função principal dar resistência às células, no entanto, pouco participa da troca de material com o ambiente externo, papel exercido essencialmente pela membrana plasmática (HOGG, 2013).

A composição da parede nos vegetais varia consideravelmente de acordo com o tipo de célula, órgão e a espécie. Contudo, são predominantes os seguintes componentes: polissacarídeos estruturais, formados por cadeias extensas de açúcares, de alto peso molecular, unidas por ligações iônicas ou covalentes. Os polissacarídeos mais comumente presentes são: celulose, principal componente; hemiceluloses e pectinas, ou compostos pécticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Para que possa ocorrer essa degradação é preciso que enzimas em conjunto possam atuar em cada estrutura composicional da parede celular, para tanto: lignina, hemicelulose e celulose são as porções poliméricas que especificamente são concebtadas entre si por ligações covalentes, produzindo uma rede complexa resistente a ataques microbianos.

A celulose que é definida como um polímero de D-glicose com ligações beta 1,4 (BISWAS et al., 2014) oferecendo uma característica de força e flexibilidade estando envolvida por lignina que, parecida com uma espécie de cimento, conferindo-lhe asssim a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. Consequinte, a hemicelulose, atua entrelaçando quimicamente a celulose e a lignina, formando unidas, blocos de pentoses como a xilose, de hexoses como a glicose e de ácidos urônicos como ácido galacturônico, açúcares que conferem flexibilidade e resistência ao vegetal (CASTRO, 2010). Por fim, as pectinases também se destacam, por constituírem um grupo amplo de enzimas que aceleram a degradação de polímeros pécticos nas paredes das células vegetais (KHAN et al., 2013) e, tendo atuação neste trabalho.

2.3 Atividades das enzimas fúngicas

Enzimas são extraídas em larga escala de microrganismos, devido a ampla gama produzida pelos mesmos e a capacidade de cultiva-los em laboratório (PALMER et al., 1991). Os microrganismos são capazes de existir em ambientes com variadas propriedades físico-químicas, no entanto, a taxa na qual suas enzimas convertem o substrato para o produto de interesse é afetada significativamente pela temperatura, pH e as concentrações tanto do substrato quanto de possíveis inibidores (HOGG, 2013).

Os fungos se alimentam por meio da secreção de enzimas extracelulares que digerem materiais poliméricos, como polissacarídeos ou proteínas, em monômeros que são assimilados como recurso de carbono e energia (MADIGAN et al., 2016). Logo, os resíduos da agroindústria, devido ao seu elevado conteúdo lignocelulósico disponível, representam uma

fonte alternativa interessante para crescimento de fungos e, conseqüentemente, produção de enzimas para aplicações industriais (SIQUEIRA, 2010).

O termo holocelulose é utilizado para se referir ao conteúdo de celulose e hemicelulose na biomassa lignocelulósica (VAZ et al., 2016). Celulases, hemicelulases e pectinases pertencem a um grupo de enzimas chamadas holocelulases que apresentam mecanismos de hidrólise ácida/básica de ligações glicosídicas com retenção ou inversão da configuração anomérica no ponto de clivagem (SIQUEIRA e FILHO, 2010).

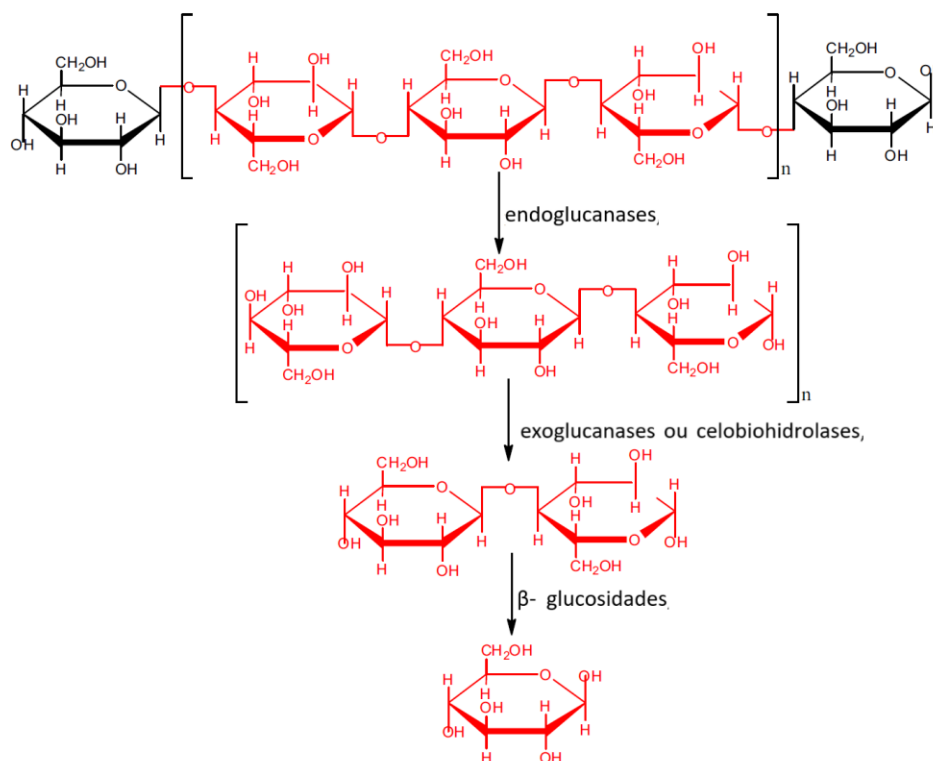
Para a eficiente hidrólise da biomassa lignocelulósica, é necessária a presença de variadas enzimas, como celulases (mais importantes, pois a celulose corresponde à maior parcela), hemicelulases, pectinases e proteínas auxiliares (PASSOS et al., 2018).

Basicamente, existem três tipos de glicosil hidrolases responsáveis pela conversão de celulose em glicose: (i) endoglucanases, responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas nas regiões amorfas da celulose, gerando longas cadeias de oligômeros; (ii) exoglucanases ou celobiohidrolases, que atuam na parte cristalina da celulose, quebrando as longas cadeias de oligômeros formadas pela ação das endoglucanases; e (iii) β -glucosidases, que hidrolisam celobiose a glicose (Figura 1) (JUTURU e WU, 2014).

A hemicelulose é um complexo substrato amorfo frequentemente composto de uma “espinha dorsal” de hétero-1,4- β -D-xilano, contando com a presença de vários grupos substituintes (BARR et al., 2012). Dessa forma, a degradação completa da hemicelulose requer a ação de uma quantidade maior de enzimas. Destacam-se, entre elas, as enzimas principais 1,4- β -xilanase e 1,4- β -xilosidase, que têm sua ação complementada pelas enzimas auxiliares α -L-arabinofuranosidase, β -feruloilesterase, β -glucuronidase e acetilxilanoesterase (GILBERT, 2010).

Por final, as pectinases atuam em reações de despolimerização e desesterificação, sendo recorrente em fungos saprófitos (LANG; DÖRNENBURG, 2000). Geralmente, as pectinases derivadas de fungos são ácidas por natureza, sendo sua fonte comercial de mais destaque os fungos filamentosos, particularmente, a espécie *Aspergillus niger* (AMIN et al., 2018).

Figura 1 - Hidrólise do polímero celulose a glicose por meio da ação de enzimas. Em vermelho: estrutura cristalina. Em preto estrutura amorfa.



Fonte: Juturu e Wu (2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Utilizar resíduos agrícolas como fonte de biomassa lignocelulósica para a produção de enzimas de interesse industrial, produzidas por fungo anemófilo coletado em área urbana da cidade de Patos de Minas-MG.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar fungo anemófilo na área urbana do município Patos de Minas;
- Verificar dentre diferentes resíduos agrícolas aqueles que melhor se destacam na produção de enzimas degradadoras da parede celular vegetal;
- Quantificar e caracterizar diferentes enzimas quanto à capacidade de degradação da biomassa vegetal, por meio de atividades enzimáticas específicas;

- Caracterizar parcialmente a atividade das enzimas através de ensaios de hidrólise.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta, isolamento, manutenção e identificação das amostras fúngicas

O local de coleta dos fungos anemófilos foi estabelecido em área central urbana na cidade de Patos de Minas, em frente ao Prédio de Laboratórios da UFU, Rua Major Jerônimo, 566.

Indivíduos fúngicos foram coletados por meio da exposição de uma placa de Petri com 15 cm de diâmetro, preenchida com aproximadamente 40 mL de meio de cultura sólido [batata-dextrose-ágar (BDA), infuso de batata desidratado 4,0 g, dextrose 20 g e ágar 15 g; pH final 5,6 à 25 °C; Pradimol Biotecnologia]. A placa foi aberta por um período de 30 minutos, na área externa ao Prédio de Laboratórios da UFU, Campus Patos de Minas, localizado à Avenida Major Jerônimo, N° 566, Bairro Centro. Em seguida, a mesma foi fechada com filme plástico e incubadas por 7 dias, no Laboratório de Microscopia, à temperatura local de 28°C a 30°C.

A placa foi monitorada diariamente para que o crescimento das amostras não ultrapasse o limite das placas de Petri. Ao final do período de incubação (Figura 2) e verificado o crescimento dos fungos, foi realizado o isolamento de indivíduos fúngicos promissores (desenvolvimento micelial e potencial de esporulação) por meio de repiques, em novas placas de Petri contendo meio sólido BDA e, mantendo as mesmas condições iniciais de incubação. Após o crescimento fúngico, as placas foram armazenadas a 4°C para utilização em ensaios de cultivo.

Figura 2 - Placa de Petri contendo meio BDA, que foi exposta ao ambiente externo do Prédio dos laboratórios, colonizada pelos fungos anemófilos após o período de 7 dias de incubação.



Fonte: Próprio autor.

A manutenção do isolado foi realizada em meio sólido BDA, por meio de repiques realizados a cada 21 dias. A identificação da morfoespécie coletada será realizada em futuros ensaios com parcerias com outras instituições e demais colegas de trabalho. Enquanto isso, a mesma ficará depositada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Campus Patos de Minas – UFU.

Análises microscópicas foram realizadas utilizando pequena porção da colônia do fungo isolado e sendo a mesma retirada com o auxílio de palitos de madeira autoclavados ou alça flambada, e colocada na superfície de lâmina microscópica devidamente preparada. Com as seguintes colorações:

- Coloração 1: A amostra foi adicionada de 0,05 mL de solução KOH 20% (m/v) em água destilada, objetivando obter informações morfológicas do indivíduo fúngico.
- Coloração 2: Procedeu-se de acordo com “coloração 1”, alterando a solução corante para Azul de Metileno 0,2 % em água destilada.

Ambas as preparações foram cobertas com lamínula limpa, levadas ao microscópio (Marca: Leica. Modelo: ICC50 HD) visualizando as placas com os corantes, utilizando aumento 1000x e conseguinte foram realizadas fotografias das imagens microscópicas utilizando o *software* LEICA Application Suite (LAS) EZ Version 3.3.

4.2 Resíduos Agrícolas

O isolado fúngico promissor foi cultivado em resíduos agrícolas [casca de arroz (CA), resíduo do beneficiamento do café (RC), engaço de bananeira (EB), resíduos completo da soja (RS), resíduo do beneficiamento café lavado (RCL) e engaço de bananeira lavado (EBL)], os quais foram gentilmente doados por produtores da região de Patos de Minas, e utilizados como fonte de biomassa lignocelulósica.

Os resíduos, do beneficiamento do café e engaço de bananeira, foram submetidos a um processo de lavagem com água corrente até que não houvesse a manifestação de sujidades na água de lavagem. Em seguida, foram colocados em recipientes de secagem e colocados em estufa a 60°C por 24 h.

Após secagem, todos os resíduos, manuseados a temperatura ambiente, foram triturados separadamente, utilizando processador de alimentos doméstico, até obter-se um material homogêneo que foi peneirado em tela de 3 mm de tamanho de poro.

4.3 Cultivo do isolado fúngico

O fungo isolado foi cultivado em estado semi-sólido, em frascos tipo *Erlenmeyer* de 250 mL, em 5 repetições dispondo de 5 gramas de cada um dos resíduos agrícolas processados (CA, RC, EB, RS, RCL e EBL). Em seguida, os resíduos foram umedecidos com 20 mL de água destilada, para se alcançar um teor de umidade de aproximadamente 65% conforme estabelecido por Kerem et al. (1992). Posteriormente, os frascos foram fechados com rolhas feitas de gaze e algodão, cobertos com papel do tipo Kraft e autoclavados a 121°C por 25 minutos.

O inóculo foi representado por 5 discos de 5 mm de diâmetro/cada utilizando ponteiras de 1000 µL cortadas, retirados de placa de Petri de repiques do fungo isolado, feitos anteriormente em meio sólido BDA. Os discos foram transferidos para cada *Erlenmeyer*, conforme estabelecido por Alexandrino e colaboradores (2007).

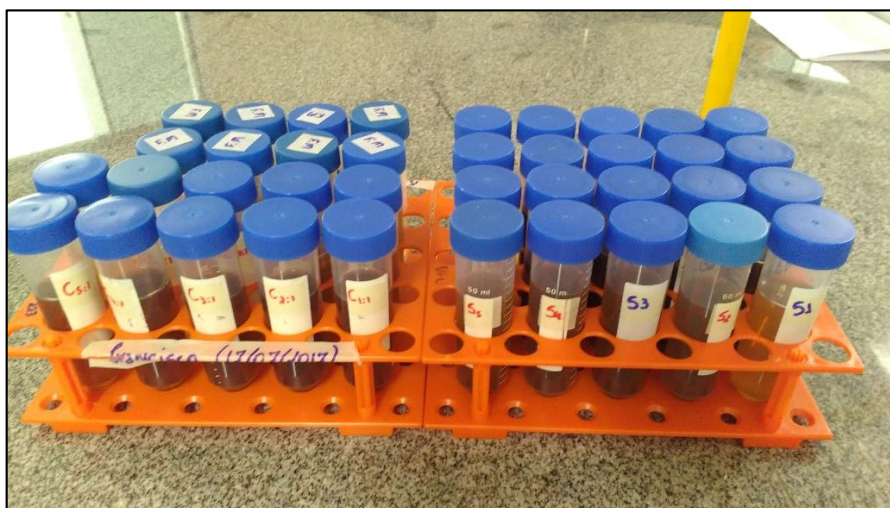
O cultivo foi efetuado em estufa microbiológica (Nova Érika (Ethik Technogy). Modelo: 402 – 5D) em temperatura de 28°C, por um período de 5 dias, em repouso, objetivando o crescimento do fungo sobre os resíduos agrícolas, para posteriores ensaios.

4.4 Produção dos extratos brutos enzimáticos

Para a produção dos extratos brutos enzimáticos após o período de 5 dias de cultivo, fez-se a extração das enzimas produzidas em cada *Erlenmeyer*, utilizando 25 mL de uma

solução tampão acetato de sódio 0,5 mol.L⁻¹, pH 5 e Tween 80 1% (v/v), utilizado para facilitar a liberação das enzimas aderidas ao substrato. Após a adição das soluções, todos *Erlenmeyes* foram submetidos à homogeneização em uma mesa agitadora tipo *shaker* (Cientec. Modelo: CT - 712) à temperatura ambiente, rotação de 100 rpm por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a filtração dos extratos em bomba a vácuo (Prismatec. Modelo: 131), utilizando funil de Buchner com papel de filtro doméstico, obtendo assim 30 amostras totais que foram classificadas de acordo com a Tabela 1. O extrato bruto filtrado (Ex), foi adicionado de uma pequena quantidade de azida sódica 0,02% (m/v) para evitar a contaminação por microrganismos e, então foram armazenados 4°C para serem utilizados como fonte de enzimas em posteriores ensaios (Figura 3).

Figura 3 - Extratos brutos enzimáticos produzidos a partir do cultivo de fungo isolado em resíduos agrícolas.



Fonte: próprio autor.

Tabela 1 - Classificação dos extratos brutos enzimáticos produzidos pelo isolado fúngico, cultivados em resíduos agrícolas.

CA	RC	EB	RS	RCL	EBL
A1	C1	EB1	S1	CL1	EBL1
A2	C2	EB2	S2	CL2	EBL2
A3	C3	EB3	S3	CL3	EBL3
A4	C4	EB4	S4	CL4	EBL4
A5	C5	EB5	S5	CL5	EBL5

CA - casca de arroz; RC - resíduo do beneficiamento do café; EB - engaço de bananeira; RS - resíduo completo da soja; RCL - resíduo do beneficiamento do café lavado e EBL - engaço de bananeira lavado.

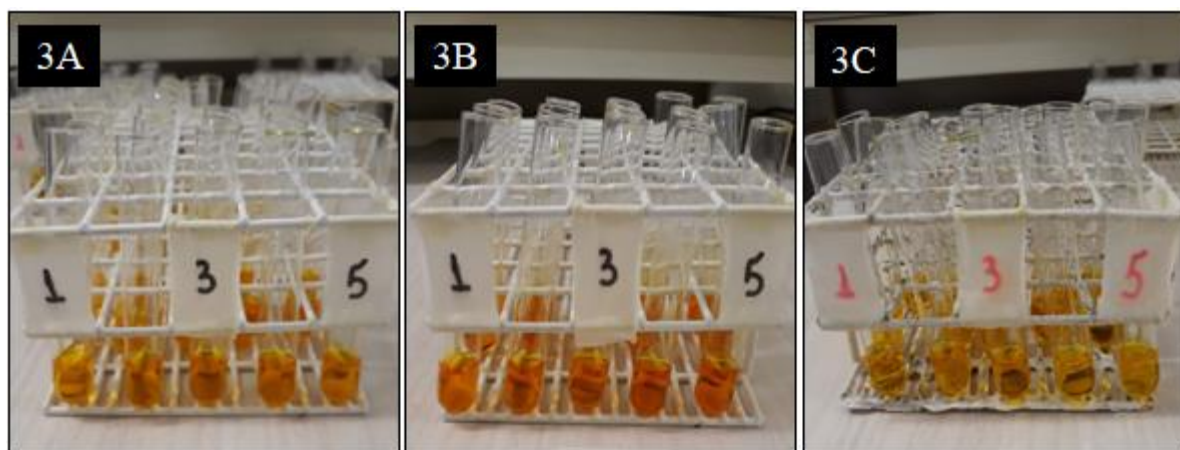
Fonte: próprio autor.

4.5 Atividades enzimáticas: xilanase, pectinase, endogluconase (CM-celulase)

Os ensaios enzimáticos para xilanase, pectinase e CM-celulase foram realizados pela reação de 1 volume do filtrado de cada cultivo (25 μL) com 2 volumes das respectivas soluções de substratos (50 μL) a 1,0% (m/v): xilana de aveia, pectina, carboximetil-celulose (CM-celulose) incubados a 50°C por 30 minutos em banho maria (Marca: Cientec. Modelo: CT - 245-28), conforme descrito por Filho et al. (1993).

Após o período de incubação, as reações foram interrompidas com a adição de 150 μL da solução de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (m/v) [ácido 3,5-dinitro-salicílico 1,0%, NaOH 16% e tartarato de sódio e potássio (4H₂O) 30%, diluídos em água destilada], sendo incubadas novamente por 10 minutos em banho maria fervente. Logo após, foi acrescentado 750 μL de água destilada, seguida de breve agitação manual (Figura 4).

Figura 4- Tubos contendo os ensaios enzimáticos para: 3A- xilanase, 3B- pectinase e 3C- CM-celulase.



Fonte: próprio autor.

A quantidade de açúcar redutor (miligramas. Litro⁻¹) liberado em cada cultivo foi quantificada pela leitura da absorbância a 540 nm (MILLER, 1959), em espectrofotômetro (Gehaka. Modelo: UV – 340G). Curvas de calibração para D-xilose, ácido D-galacturônico e D-glicose foram preparadas para concentrações finais de 0,2 a 1,2 mg.mL⁻¹. Uma unidade de atividade enzimática (UI.mL⁻¹) foi definida como a quantidade de açúcar redutor liberado na unidade de tempo por mililitro (μmol de açúcar redutor.min⁻¹.mL⁻¹).

4.6 Dosagem do açúcar redutor total liberado

Pelo método de DNS (utilizado no item anterior) fez-se a quantificação de açúcar redutor total (Miller, 1959). Para isso, foi utilizado 75 μL do filtrado dos cultivos, adicionados de 150 μL de solução de DNS e, posteriormente incubação da mistura de reação em água fervente por 10 minutos. Adicionou-se 750 μL de água destilada após a incubação, seguida de breve agitação manual e leitura em espectrofotômetro (Gehaka. Modelo: UV – 340G) a 540 nm. A concentração de açúcar redutor total foi expressa em mg.mL^{-1} e foi utilizada a curva de calibração do DNS para a D-glicose como referência.

4.7 Dosagem de proteínas totais

Ensaio para a determinação da concentração total de proteínas foi realizado de acordo com o método descrito por Bradford (1976). A determinação foi realizada pela mistura do volume de 100 μL de amostra dos filtrados enzimáticos e 1,0 mL do reagente de Bradford [100 mg Coomassie Blue G-250, 50 mL de etanol 95% (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85% (v/v)], fazendo a incubação durante 10 minutos a temperatura ambiente. Foram feitas em espectrofotômetro (Gehaka. Modelo: UV – 340G) a leitura da absorbância a 595 nm para essa determinação. Os valores das absorbâncias foram inseridos em gráfico contra a curva de calibração, variando de 0 a 100 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$, a partir de uma solução de albumina sérica bovina (albumina bovina fração V, segundo cohn, grau padrão, INLAB Brasil) 10 mg.mL^{-1} diluída em $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, utilizada como proteína de referência.

4.8 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática dos filtrados

A influência da temperatura nas atividades enzimáticas foi avaliada com ensaios das amostras dos filtrados dos cultivos em seis diferentes temperaturas, sendo elas 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C conforme estabelecido por Duarte, 2012. Posteriormente, o ensaio enzimático para cada atividade foi realizado conforme descrito no item 4.5.

4.9 Efeito do pH sobre a atividade enzimática dos filtrados

A verificação da influência do pH foi realizada através de ensaio das atividades enzimáticas em diferentes pHs, a temperatura de 50°C, fazendo o uso de tampão acetato de sódio, pH 4,5, fosfato de sódio, pH 6,5 e Tris-HCl, pH 8, todos a 100 mmol.L^{-1} (Duarte, 2012).

Posteriormente, os ensaios enzimáticos para cada atividade foram realizados utilizando 12,5 μL de cada extrato de enzima, 37,5 μL dos respectivos tampões mencionados anteriormente e 25 μL de substrato [xilana, pectina e carboximetil-celulose (CM-celulose)], em seguida foram feitos os mesmos procedimentos realizados conforme o item 4.5.

4.10 Atividade de hidrólise com bagaço de cana-de-açúcar

Ensaio preliminar de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em frascos *Erlenmeyers* de 25 mL contendo 2/3 de solução de substrato [4,5 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 4,5, 60,3 mg de material lignocelulósico (bagaço de cana-de-açúcar, lavado em água corrente e triturado em moinho de bancada) e 1,5 mL de água destilada], somado a 1/3 de solução de enzimas (extrato bruto do cultivo em RS), 3,0 mL, completando um volume final de 9,0 mL. Uma pequena quantidade de azida sódica 0,2 mmol.L⁻¹ foi adicionada para evitar contaminação por micro-organismos. Os frascos foram fechados por *Parafilm*, cobertos por papel alumínio. A mistura de reação foi incubada a 50°C sob agitação orbital de 120 rpm. Amostras de 300 μL foram retiradas periodicamente nos intervalos de 0, 12, 24, 36 e 48 horas para serem utilizadas na quantificação de açúcares redutores totais, conforme descrito no item 4.5 (adaptado de TAVARES et al., 2013).

4.11 Análises estatísticas

Para verificar se houve diferenças significativas entre as médias dos tratamentos (substratos) e também se houve interação entre um fator (enzima) na presença de outro fator (temperatura e pH os quais os respectivos resultados são demonstrados em tabela no Apêndice), foi feita análise de variância, usando teste F com nível de significância de 5%. Quando as interações foram significativas, seguiu-se com desdobramento para estudar o nível de um fator dentro do outro. Para os testes de média foi usado o teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%. Toda a análise estatística foi executada utilizando o programa R version 3.4.4 (2018-03-15) - "Someone to Lean On" - Copyright (C) 2018 The R Foundation for Statistical Computing.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta, isolamento, manutenção e análise morfológica das amostras fúngicas

Inicialmente, neste estudo buscou-se o isolamento de fungos anemofílicos por meio da exposição de placa de Petri à atmosfera urbana central de Patos de Minas. Neste sentido, um indivíduo fúngico, identificado como “Morfoespécie Fungo Marrom” (MFM) mostrou-se relevante visualmente, quanto a pigmentação do micélio-esporos e também pela separação espacial de outras colônias de fungos também crescidas (Figura 5).

Figura 5 - Anverso da placa de Petri contendo meio BDA, onde foram visualizadas diversas morfoespécies (fungos e bactérias), após incubação a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) por 7 dias. MFM foi marcado por um quadrado azul.



Fonte: próprio autor.

A partir dessa escolha, em meio BDA foi realizada a manutenção do isolado fúngico selecionado, o qual não possui uma identificação taxonômica adequada, sendo denominado MFM, seguindo o protocolo no sub-item 4.1 (Figura 6).

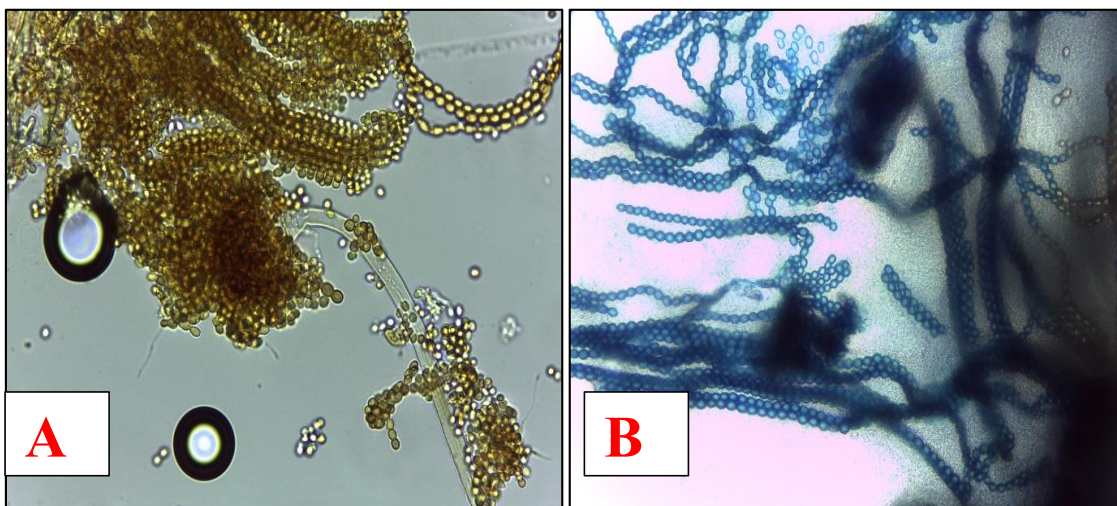
Figura 6– Placa de Petri colonizada com a MFM a partir do fungo selecionado na placa inicial.



Fonte: próprio autor.

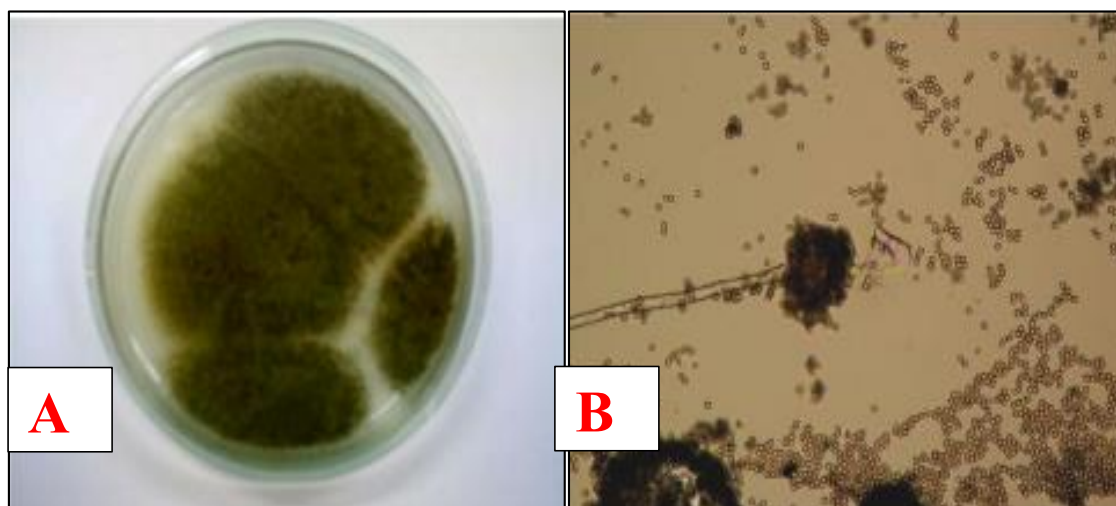
Amostras retiradas do MFM levadas ao microscópio, puderam nos mostrar com maior clareza estruturas presentes do fungo, tais como emaranhados de conídio e esporos (Figura 7 A e B), as quais comparadas ao trabalho de Duarte 2013, apresentam morfologia semelhante à outro fungo *Aspergillus oryzae*, também trabalhado por nosso grupo (Figura 8 A e B) e comparada a outros fungos mencionados por Siqueira (2010) (*Aspergillus nidullans* ou *Aspergillus oryzae*) (Figura 9 A, B, C e D), apontando assim, que o isolado MFM em estudo possa pertence ao gênero *Aspegillus*.

Figura 7– Imagens microscópicas da amostra da MFM corada com: a) KOH 20% e b) Azul de Metileno. Imagens obtidas em microscópio Leica ICC50 HD e software LEICA Application Suite (LAS) EZ Version 3.3.



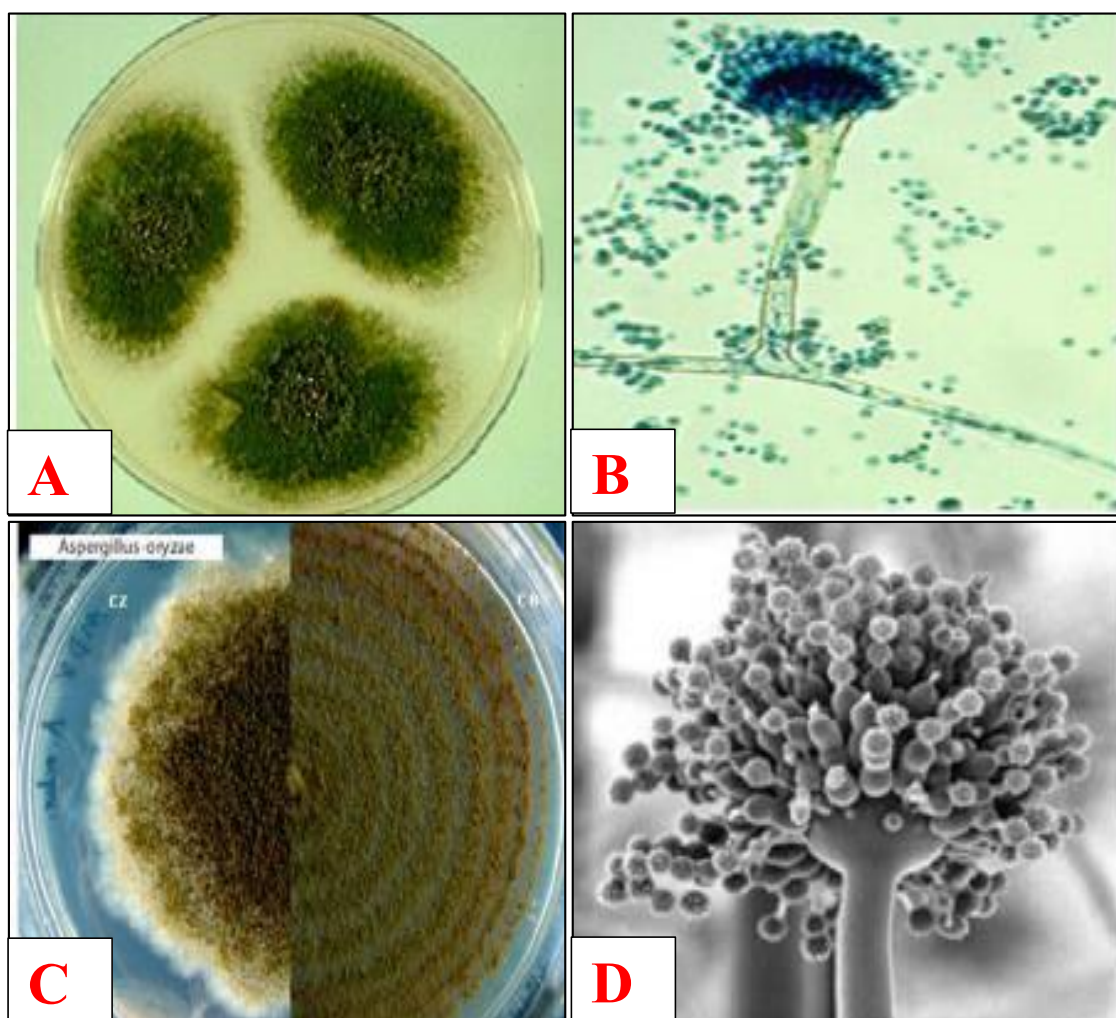
Fonte: Próprio autor.

Figura 8- Amostra de cultivo do fungo *A. oryzae* em meio sólido (A); estruturas como esporos e conídios observadas em lâmina microscópica (B), visualizada em microscópio de luz.



Fonte: Adaptado de Duarte (2013).

Figura 9— Imagens de grandes colônias de fungos e de suas respectivas microscopias de luz e eletrônicas de varredura de: *Aspergillus nidulans* (A e B); *Aspergillus oryzae* (C e D).



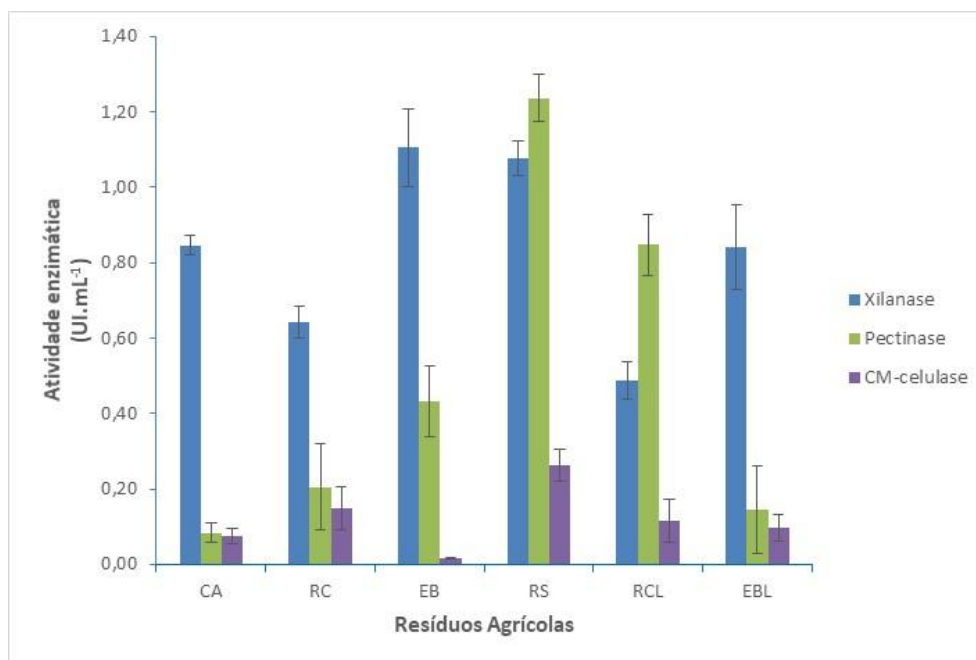
Fonte: Adaptado de Siqueira (2010).

5.2 Caracterização dos extratos brutos enzimáticos

O isolado fúngico foi submetido a cultivo em resíduos agrícolas CA, RC, EB, RS, RCL, e EBL, visando um ambiente “ideal” e a produção de enzimas de degradação da biomassa lignocelulósica. Por meio de ensaios enzimáticos dirigidos a enzimas lignocelulolíticas, pode-se identificar e quantificar a atividade de xilanases, pectinases e CM-celulases.

A partir dos diferentes resíduos utilizados como fonte de carbono para a degradação da biomassa lignocelulósica, foram obtidas amostras de extratos brutos (Ex) conforme apresentado na Tabela 1, realizando posteriormente os ensaios estabelecidos para atividade de xilanases, pectinases e CM-celulases, cujos resultados estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Atividades enzimáticas (xilanase, pectinase e CM-celulase) dos extratos brutos obtidos após cultivo do isolado MFM em resíduos agrícolas (CA - casca de arroz; RC - resíduo do beneficiamento do café; EB - engaço de bananeira; RS - resíduo completo da soja; RCL – resíduo do beneficiamento do café lavado e EBL – engaço de bananeira lavado), após incubação por 5 dias à temperatura ambiente (~25°C.)



Fonte: Próprio autor.

De acordo com a Figura 10, há indícios que o isolado MFM conseguiu, produzir enzimas lignocelulósicas em todos os resíduos testados. Em termos de produção de CM-celulase, a atividade não foi tão expressiva em nenhum dos resíduos agrícolas quanto as outras enzimas,

com valor máximo de $0,262 \text{ UI.mL}^{-1}$ em RS. Entre todos os resíduos agrícolas, MFM, utilizando o RS como fonte de carbono, revelou a melhor produção para pectinase com valor máximo de $1,237 \text{ UI.mL}^{-1}$. Para a xilanase, MFM cultivado em EB, o valor alcançado foi de $1,106 \text{ UI.mL}^{-1}$. Entretanto o melhor perfil de MFM para produção as três enzimas lignocelulósicas foi obtido com o RS, de acordo com a tabela 2.

Os resíduos gerados a partir da colheita da soja têm composição química geral (50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina), a qual se oferece como um ótimo substrato para crescer e desenvolver microrganismos que são capazes de realizarem a bioconversão de carboidratos mais complexos em menos complexos (CUNHA et al., 2016).

Em relação aos resíduos do beneficiamento do café (RC e RCL), também houve diferença na produção enzimática, principalmente para a atividade pectinase, cujos valores foram de $0,206 \pm 0,113 \text{ UI.mL}^{-1}$ e $0,847 \pm 0,081 \text{ UI.mL}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados parecem indicar que durante o processo de lavagem, possivelmente, algum interferente (ainda não identificado) foi removido e essa remoção proporcionou um aumento de cerca de 4x na atividade pectinase. FAN et al. (2000) explicou que no resíduo do beneficiamento do café como a casca e a folha possuem altas concentrações de uma gama de nutrientes de natureza orgânica, somado à presença de elementos tóxicos, tais como cafeína, polifenóis e taninos.

A análise de variância revelou ocorrer interação significativa entre as atividades enzimáticas produzidas por MFM e os respectivos resíduos utilizados nos cultivos ($P < 0,05$). Como os tratamentos mostraram-se diferentes, foi feito o teste de Scott-Knott, com significância de 5% para verificar qual tratamento obteve maior média (Tabela 2). Segundo essa análise, os resíduos EB e RS induziram os maiores valores para a atividade xilanase, correspondendo a $1,1054 \text{ UI.mL}^{-1}$ e $1,0950 \text{ UI.mL}^{-1}$, respectivamente. Para a atividade pectinase, MFM a melhor composição de indutores da atividade, no resíduo RS, cujo valor foi de $1,2372 \text{ UI.mL}^{-1}$. Com referência à atividade CM-celulase, o teste de Scott-Knott afirmou, também, o resíduo RS como indutor de maior produção para essa atividade, com valor de $0,2620 \text{ UI.mL}^{-1}$ (Tabela 2). Por apresentarem a mesma letra, o teste que valores iguais pode indicar similaridade na composição de constituintes indutores para essa atividade.

Tabela 2 - Estatística aplicada às médias aritméticas das atividades enzimáticas produzidas por MEB quando cultivado em diferentes resíduos agrícolas.

Resíduos Agrícolas	Médias das atividades enzimáticas (UI.mL^{-1})
--------------------	--

	Xilanase	Pectinase	CM-celulase
CA	0.8658 b	0.0832 d	0.0766 d
RC	0.6422 c	0.2058 d	0.1490 b
EB	1.1054 a	0.4340 c	0.0162 e
RS	1.0950 a	1.2372 a	0.2620 a
RCL	0.4886 d	0.8468 b	0.1160 c
EBL	0.8422 b	0.1458 d	0.0972 d

CA – Casca de arroz; RC – Resíduo do beneficiamento do café; EB – Engaço de bananeira; RS – Resíduo completo da soja; RCL – Resíduo do beneficiamento do café lavado; EBL – Engaço de bananeira lavado. Médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais, pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Fonte: Próprio autor.

5.3 Açúcar redutor total e proteína total

Os extratos brutos de enzimas, os quais foram produzidos pelo MFM, foram quantificados quanto ao teor de açúcar redutor total (AR-total) para verificação se a presença de açúcar redutor livre estaria envolvido na produção de enzimas. Conforme observado na figura 11, os valores obtidos para o AR-total são maiores em no RC com valor máximo alcançado 2,653 mg.mL⁻¹, seguido pelo EB com valor máximo obtido de 2,628 mg.mL⁻¹.

Lipídeos, compostos fenólicos e açúcares livres em excesso são principais exemplos de interferentes (ZAIA et al, 1998).

Estudos realizados mostram que o resíduo de beneficiamento do café é rico em compostos orgânicos (taninos, polifenóis e cafeína), em nutrientes, e que seus extratos podem exercerem boas atividades antioxidante (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; MURTHY; NAIDU, 2012).

Segundo Durán et al. (2017), a casca do café gerada após o beneficiamento, representa em média 12 % do peso total do grão, sendo constituída de 43% de celulose, 7% hemicelulose, 5% taninos, 2,5% ácidos clorogênicos, 1% cafeína, 7 a 9,2% de proteínas e 5,4% de minerais, entre outros componentes como lipídios, polifenóis e açúcares redutores em concentrações diferentes dependendo do tipo de análise dos resíduos.

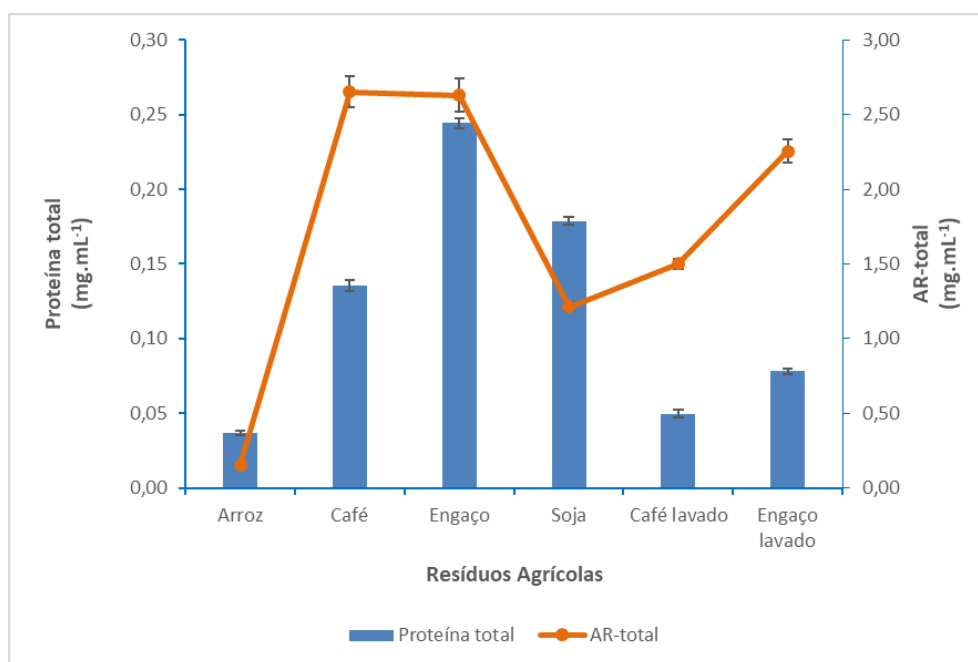
Conforme apresentado na Figura 11, é observável que o extrato obtido por MFM cultivado em EB teve valores superiores de proteína total com cerca de 0,244 mg.mL⁻¹ seguido do EB-RS que obteve o valor de 0,179 mg.mL⁻¹.

O EB-RS, com a segundo maior teor de proteínas totais, pode referir-se às proteínas que são produzidas pelos fungos ou a proteínas contidas no próprio resíduo do beneficiamento da

soja, tal que o mesmo pode conter partes da planta, incluindo grãos, assim como descreveu Bergamaschine et al. (1999).

Freitas (2006) apresenta a análise bromatológica de um resíduo de soja (composto de grãos pequenos e quebrados, vargens, hastes e folhas) sendo composto por 85,1 % de matéria seca, 33,3 % proteína bruta, 9,6 % carboidratos solúveis, 10,2 % hemicelulose, 15,1 % lignina.

Figura 11– Dosagem de proteína total (método de Bradford) e açúcar redutor total (AR-total) dos extratos brutos enzimáticos, produzido pelo isolado MFM durante o cultivo nos resíduos agrícolas (casca de arroz, resíduo completo da soja e resíduo do beneficiamento do café). As quantificações foram expressas em mg.mL^{-1} .



Fonte: Próprio autor.

5.4 Efeito da temperatura e do pH sobre as atividades enzimáticas

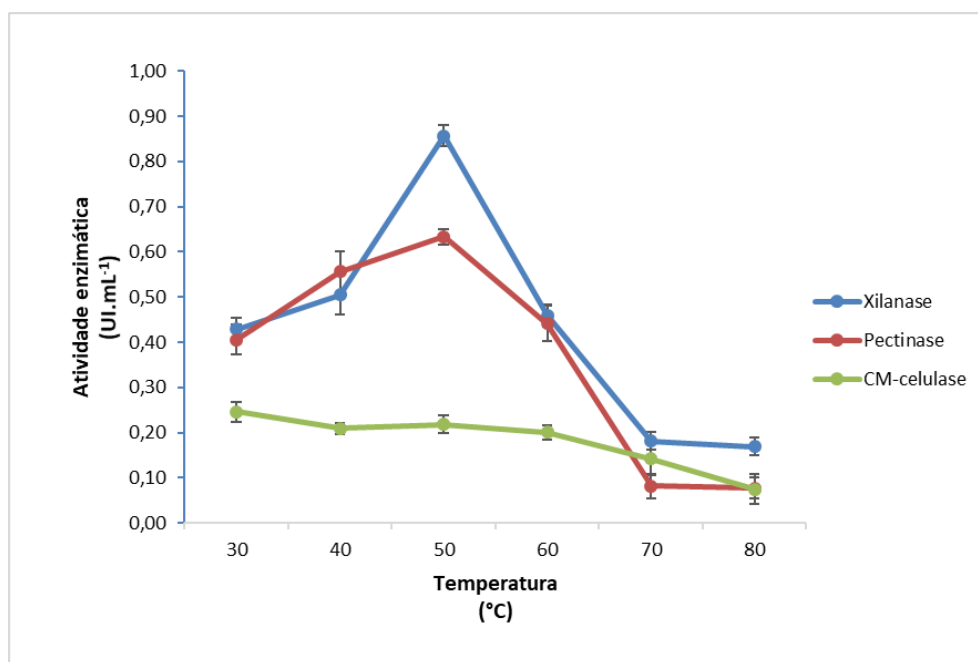
Após os resultados obtidos anteriormente, identificando e quantificando as melhores atividades enzimáticas produzidas pela MFM, o extrato enzimático utilizando como fonte de carbono o resíduo RS indicou-se mais promissor. Sendo assim, o Ex-RS foi submetido a ensaios para caracterização de temperatura e pH, para obter as melhores condições de catálise mistura de enzimas produzidas por MFM, e posteriormente realização de aplicação biotecnológica.

O Ex-RS, quando submetido a ensaios em diferentes temperaturas, teve sua melhor atuação em 50°C para as atividade de xilanase e pectinase, correspondendo a $0,857 \text{ UI.mL}^{-1}$ e

0,633 UI.mL⁻¹ respectivamente, e um intervalo de 30°C a 60°C para a atividade CM-celulase correspondendo a um valor médio de $0,219 \pm 0,018$ UI.mL⁻¹ (Figura 12).

Carvalho (2011), mencionou que ao fazer o aumento da temperatura até determinado ponto, haverá a promoção da atividade enzimática, contudo, ultrapassando a temperatura limitante da ação da enzima, fará que ocorra a desnaturação da mesma. Destaca-se também, a desnaturação por pHs muito ácidos.

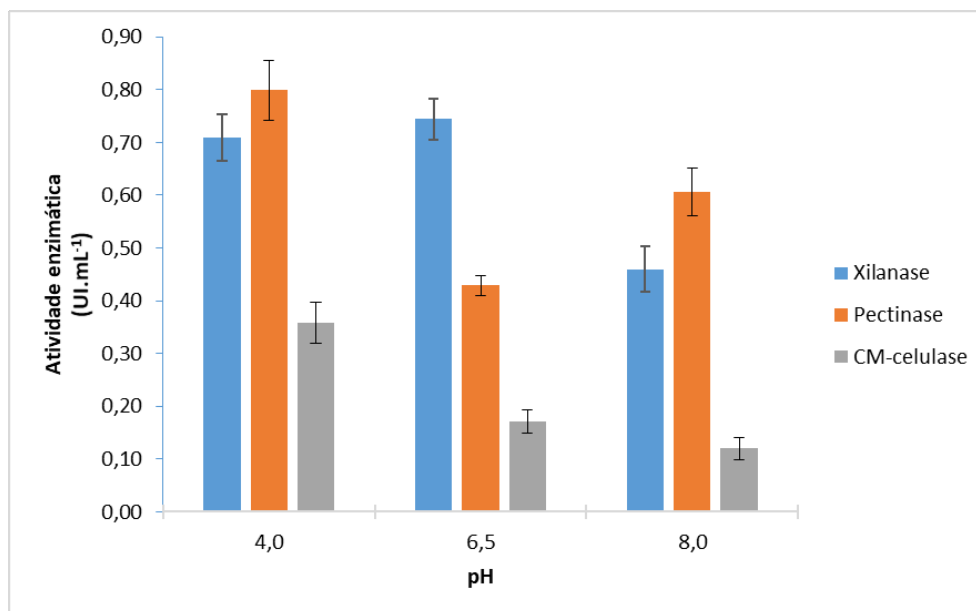
Figura 12 – Influência da temperatura nas atividades enzimáticas (xilanase, pectinase e CM-celulase) presentes no extrato bruto enzimático produzido por MFM após cultivo no resíduo completo da soja (RS). Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descrito.



Fonte: Próprio autor.

Conforme mostrado na Figura 13, o resultado para caracterização de pH teve indícios que as atividades enzimáticas testadas apresentaram maior expressividade em condições de pH ácido. Para xilanase, as maiores atividades ocorreram em pHs 6,5 e 4, com valores de $0,744 \pm 0,038$ UI.mL⁻¹ e $0,710 \pm 0,044$ UI.mL⁻¹, respectivamente. Semelhante à atividade xilanase, as melhores atividades para pectinase e CM-celulase foram quantificadas a pH 4, correspondendo a $0,799 \pm 0,057$ UI.mL⁻¹ e $0,358 \pm 0,040$ UI.mL⁻¹, respectivamente (Figura 13). Juntamente ao perfil das melhores atividades sendo bem caracterizado em condições ácidas, a atividade pectinase do resíduo RS mostrou expressiva atividade em condições alcalinas, mais especificamente em pH 8, com valor de $0,607 \pm 0,045$ UI.mL⁻¹.

Figura 13- Influência do pH na atividade das enzimas presentes no EB enzimático produzido por MEB após cultivo no resíduo casca de arroz. Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme item 3.5, ajustando dentro do volume final de reação (75 μL), a inclusão do volumen de 37,5 μL de cada tampão testado: acetato de sódio (4,5), fosfato de sódio (6,5) e Tri-HCl (8,0), todos a 0,1 mol.L⁻¹. As demais etapas seguiram conforme descrito.



Fonte: Próprio autor.

Corroborando com os resultados de caracterização enzimática parciais alcançados, Castro e Pereira-Jr (2010), mostraram que celulasas produzidas por fungos filamentosos (*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Humicola*), demonstram valores ótimos de atividade em pH em condições ácidas, que variam na faixa de 3,6 a 5. Em estudo Marília et al. (2010) mostraram que diversas espécies de *Aspergillus* apresentaram as melhores atividades enzimáticas em pHs ácidos.

5.5 Hidrólise Enzimática

A partir dos ensaios de identificação e caracterização parcial das atividades enzimáticas produzidas por MFM, buscou-se desenvolver uma metodologia para avaliar o potencial de utilização do extrato bruto enzimático do resíduo RS em ensaios de hidrólise, tendo o bagaço de cana-de-açúcar lavado em água corrente como substrato. Para esse ensaio, há indícios que as condições de melhor atividade enzimática foram de 50°C e pH 4, conforme estabelecidas na etapa de caracterização enzimática parcial. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 -. Representação dos valores de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar “lavado” e “explodido a vapor”, representados pela dosagem de açúcar redutor total (AR-total), nos tempos de 0, 12, 24, 38 e 48 horas.

Tempo de Hidrólise (horas)	AR-total (mg.mL ⁻¹)*	Hidrólise (%)**
0	0,008 ± 0,022	0,11
12	0,187 ± 0,032	2,79
24	0,097 ± 0,025	1,45
36	0,155 ± 0,027	2,32
48	0,055 ± 0,039	0,82

*As quantidades de açúcar redutor total liberado foram estimados pelo método de DNS conforme descrito no Item 4.6.

**A porcentagem de hidrólise foi obtida tomando como referência de 100% a quantidade de biomassa utilizada no início do ensaio, relacionada à cada quantificação em mg.mL⁻¹ obtida ao final de tempo de incubação.

Fonte: Próprio autor.

Ao verificar os valores de AR-total obtidos na Tabela 3, observa-se que desde o tempo 0 de hidrólise, as enzimas produzidas pela MFM em RS, já promoveram a liberação mesmo que baixa, de $0,008 \pm 0,022$ mg.mL⁻¹ de açúcar redutor. No ensaio realizado para atividade de hidrólise, infere-se que a maior atividade ocorreu no período de 12 horas, tendo como valor $0,187 \pm 0,032$ mg.mL⁻¹ correspondendo a 2,79% de hidrólise. Após o período de 48 horas de atividade, verifica-se um percentual total de 7,49%. Ogeda et al (2010) mencionaram que normalmente, as hidrólises enzimáticas alcançam um rendimento de açúcar menor que 20%, enquanto que quando utilizada etapas de pré-tratamentos, pode-se alcançar um rendimento maior que 90%.

A composição do bagaço de cana-de-açúcar é de 32-48% de celulose, 19-24% de hemicelulose e 23-32% de lignina (BANERJEE; PANEY 2002). Com isso podemos inferir que, a quantidade de lignina é responsável pela menor eficiência das enzimas produtoras de açúcares redutor total. Sun e Cheng (2002) mostraram que outros fatores podem interferir além da lignina, como a presença de fibras cristalinas na celulose, bem como a quantidade de hemicelulose.

Uma alternativa a ser proposta antes da utilização do bagaço de cana-de-açúcar, é realizar pré-tratamentos que são representados por etapas químicas, que se inclui pré-tratamentos ácidos, alcalinos e oxidativos (Ogeda et al., 2010). Conforme apresentado por Odisi (2013), por meio de microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar que o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar proporcionou o surgimento de alterações físicas na superfície do bagaço, proporcionando um maior acesso para a enzima.

6 CONCLUSÃO

No trabalho proposto pode-se verificar a presença de diferentes fungos na região central de Patos de Minas, quando se expôs apenas uma placa de Petri com meio BDA, para que fosse escolhido um isolado, para dar continuidade ao trabalho. O isolado o qual foi denominado MFM, se mostrou eficiente em seu crescimento e desenvolvimento nos diversos resíduos agrícolas, tendo o resíduo completo da soja como melhor para produção enzimática (xilanase, pectinase e CM-celulase), destacando-se para produção de xilanase.

Indícios apontam que as melhores condições de atividades para xilanase foi a 50°C e pH 4,0. Com essa verificação de melhor eficiência foi feita a aplicação enzimática para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com a xilanase, controlando pH e temperatura para a enzima apresentasse melhor desempenho. Contudo, mesmo existindo atividade de hidrólise, a mesma mostrou-se com baixa eficiência.

REFERÊNCIAS

BISWAS, R.; ABHISHEK, P; VIRENDRA, S, B. Production of Cellulolytic Enzymes. **Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts**. 1ª Edição. BioEnergy Science Center, Biosciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA. Publicado em 2014.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. **International journal of biological macromolecules**, 2018.

ALEXANDRINO A, M; et, al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Volume 27. Número 2. Campinas- SP. Abril-Junho 2007.

BARR, C. J.; MERTENS, J. A.; SCHALL, C. A. Critical cellulase and hemicellulase activities for hydrolysis of ionic liquid pretreated biomass. **Bioresource technology**, v. 104, p. 480-485, 2012.

BRADFORD, M, M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. Volume 72. Páginas 248-254. 1976.

CARVALHO, M., 2011. Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. Brasil.

CASTRO, A, M. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Revista Química Nova**. Volume 33. Número 1. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello, Petróleo Brasileiro S.A. Rio de Janeiro-RJ, Setembro 2009.

DUARTE, G, C; et, al. Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Revista Applied Sciences**. Volume 2. Páginas 754-772. Outubro 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood—chemistry, ultrastructure, reactions**. Journal Of Polymer Science: Polymer Letters Edition, [s.l.], v. 23, n. 11, p.601-602, nov. 1985.

FILHO, E, X, F; et.al. Biochemical characteristics of two endo-1,4-b -D-xylanases isolated from solid state cultures of *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**. 11. Páginas 171-180. 1993.

GHOSE, T, K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**. Volume 59. Páginas 257-268. Janeiro 1987.

GILBERT, H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 444–455, jun. 2010.

HOGG, S. **Essential microbiology**. John Wiley & Sons, 2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188-203, 2014.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 366-375, abr. 2000.

MADIGAN, M, T; MARTINKO, J, M; DUNLAP, V; CLARK, D, P. **Microbiologia de Brock**. 12ª Edição. 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª** Edição. Artmed Editora, 2016.

MARÍLIA, R, S. et al. **Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus***. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2010001100009

MILLER, G, L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31 (3). Páginas 426-428. Março 1959.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2011. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/883400/1/DOC236.pdf>. Acesso em 20 Jun. 2018.

MOURA, L, F W, G; et, al. Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do centro vocacional tecnológico (cvt) de Tauá- CE. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Volume 15, n.2, p.157-165. Campina Grande-PB, 2013.

OGEDA, T. L.; et. al. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Quim. Nova**. Volume 33, n.7. São Paulo, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>. Acesso 20/06/2019.

ODISI, E. J. SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DEAÇÚCAR PRÉ-TRATADO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ADICIONADO DE ÁLCALI OU CINZAS. **Dissertação Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/103531/316860.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 03/07/2019.

PALMER, T. et al. **Understanding enzymes**. E. Horwood, 1991.

PASSOS, D. F.; PEREIRA-JR, N.; CASTRO, A. M. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 60-66, 2018.

SANTOS, A. F. et al. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 5, 1004-1010. Viçosa, 2012.

SIQUEIRA, F. G. et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20-26, 2010.

SIQUEIRA, F. G.; FILHO, E. X. F. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 54-60, 2010.

TAVARES, E. Q. P.; RUBINI, M. R.; MELO-DE-SOUSA, T. M. et al., An acid thermostable recombinant *Aspergillus nidulans* endoglucanase is active towards distinct agriculture residues. **Enzyme Research**, vol. 2013, Article ID 287343, 10 pages, 2013.

TAMANINI, C. et. al. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**. Volume 25. Número 4. Páginas 315-330. Londrina-PR, Outubro-Dezembro 2004.

VAZ, R. P.; MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F.. An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 127-135, 2016.

SUN, Y; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresouce Technology**. Volume 83, pages 1-11, Issue May 2002.

APÊNDICES

Tabelas para as análises estatísticas de temperatura e pH.

Para verificar se houve diferença entre os substratos dentro dos diferentes Temperaturas, foi feita análise de variância. Pelo teste F a 5%, verificou-se que houve diferença entre os tratamentos e entre as Temperaturas. Houve diferença também na interação substrato dentro das diferentes temperaturas.

Tratamento dentro das diferentes Temperaturas						
	30°	40°	50°	60°	70°	80°
Substratos	Médias					
CMC	0.2460 b	0.2094 b	0.2182 c	0.2008 b	0.1422 a	0.0752b
Pectina	0.4056 a	0.5560 a	0.6336 b	0.4416 a	0.0824 b	0.0772b
Xilana	0.4286 a	0.5044 a	0.8572 a	0.4596 a	0.1820 a	0.1688a

Médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais, pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Para verificar se houve diferença entre os substratos dentro dos diferentes níveis de pH, foi feita análise de variância. Pelo teste F a 5%, verificou-se que houve diferença entre os tratamentos e entre os níveis de pH. Houve diferença também na interação substrato dentro de cada nível de pH. Como as iterações foram significativas, foi feito o desdobramento para estudar os efeitos dos substratos dentro de pH e Temperaturas. Os resultados estão a seguir.

Tratamento dentro dos diferentes níveis de pH			
	4.5	6.5	8
Substratos	Médias		
CMC	0.3582 c	0.1708 c	0.1194 c
Pectina	0.7986 a	0.4286 b	0.6068 a
Xilana	0.7098 b	0.7442 a	0.4600 b

Médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais, pelo teste de Scott-Knott a 5%.